



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6

C07H 17/02, C12P 19/58, A61K  
31/71, C09K 15/30, C12N 1/20 //  
(C12P 19/58, C12R 1:465) (C12N  
1/20, C12R 1:465)

A1

(11) 国際公開番号

WO96/22996

(43) 国際公開日

1996年8月1日(01.08.96)

(21) 国際出願番号

PCT/JP96/00128

(22) 国際出願日

1996年1月25日(25.01.96)

(30) 優先権データ

特願平7/30152	1995年1月25日(25.01.95)	JP
特願平7/31482	1995年1月27日(27.01.95)	JP

(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)

日本ケミファ株式会社

(NIPPON CHEMIPHAR CO., LTD.)(JP/JP)

〒101 東京都千代田区岩本町2丁目2番3号 Tokyo, (JP)

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)

瀬戸治男(SETO, Haruo)(JP/JP)

〒192 東京都八王子市上野町100-5 Tokyo, (JP)

新家一男(SHIN-YA, Kazuo)(JP/JP)

〒120 東京都足立区足立1-5-7-703

キャッスルマンション五反野 Tokyo, (JP)

(74) 代理人

弁理士 柳川泰男(YANAGAWA, Yasuo)

〒160 東京都新宿区四谷2-14, ミツヤ四谷ビル8階 Tokyo, (JP)

(81) 指定国

AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS,  
KG, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ,  
PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, 欧州特許  
(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG), ユーラシア特許(AZ, BY, KZ, RU, TJ, TM),  
ARIPO特許(KE, LS, MW, SD, SZ, UG).

添付公開書類

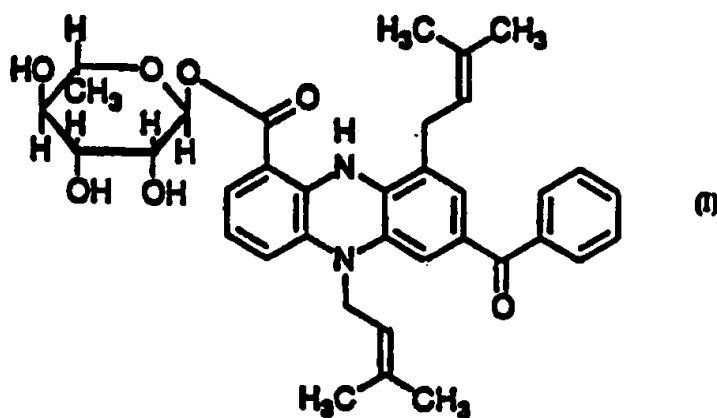
国際調査報告書

(54) Title: DIHYDROPHENAZINE DERIVATIVES

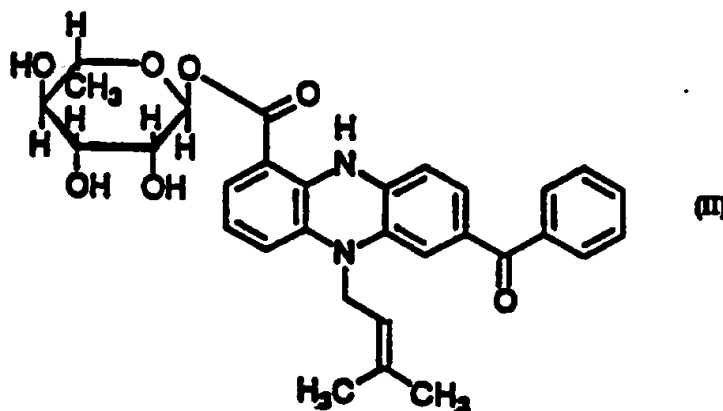
(54) 発明の名称 ジヒドロフェナジン誘導体

(57) Abstract

Dihydrophenazine derivatives represented by structural formulae (I, II), obtained from the strains of ray fungi of the genus *Streptomyces* deposited with an international depository authority, and having an antioxidant effect and the effect of suppressing the toxicity of L-glutamic acid against mammalian neurons.



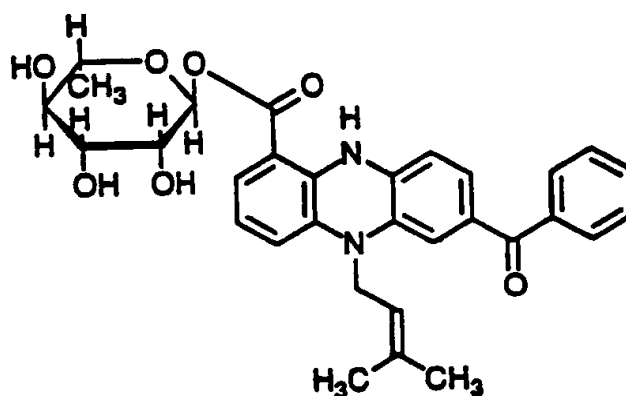
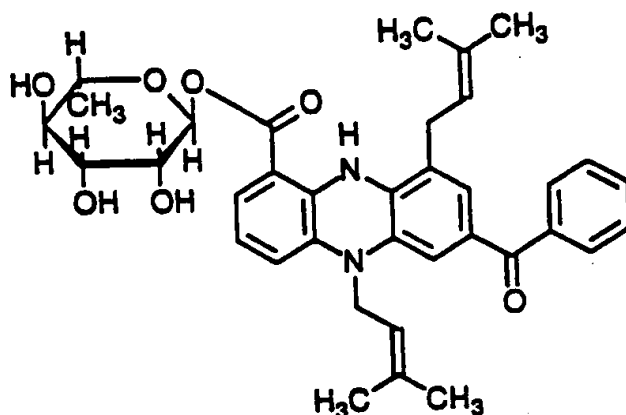
(I)



(II)

(57) 要約

国際寄託されたストレプトマイセス属に属する放線菌の菌株から得られ、抗酸化作用及び哺乳類の神経細胞に対するL-グルタミン酸の毒性を抑制する作用を有する下記のいずれかの式で表わされるジヒドロフェナジン誘導体である。



情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AU	オーストラリア	EE	エストニア	KR	韓国	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	ES	スペイン	LR	リベリア	SE	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FI	フィンランド	LS	レソト	SG	シンガポール
BB	バルバドス	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロバキア
BE	ベルギー	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GG	ガイアナ	LV	ラトヴィア	SD	スーダン
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	MC	モナコ	SI	スロベニア
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SK	スロバキア
BR	ブラジル	GU	グアテマラ	MG	マダガスカル	SL	シエラレオネ
BY	ベラルーシ	HE	ハンガリー	MA	マダガスカル	ST	サントメ・プリンシペ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	ML	マリ	TH	タイ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MW	モザンビーク	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	MX	メキシコ	TV	ツバル
CI	コート・ジボワール	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KR	韓国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ			NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェッコ共和国					VN	ベトナム

明 細  
ジヒドロフェナジン誘導体

〔技術分野〕

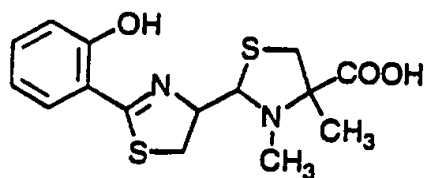
本発明は、新規なジヒドロフェナジン誘導体、それを生産できる菌株、およびそれを用いた医薬品に関するものである。

〔背景技術〕

L-グルタミン酸は、タンパク質を構成する天然のアミノ酸の一種であるが、神経細胞に対する毒性を有していることが知られている。このグルタミン酸毒性を抑制する作用を有する物質が得られれば、その物質は脳代謝を賦活したり改善するための医薬として利用できることが予想される。

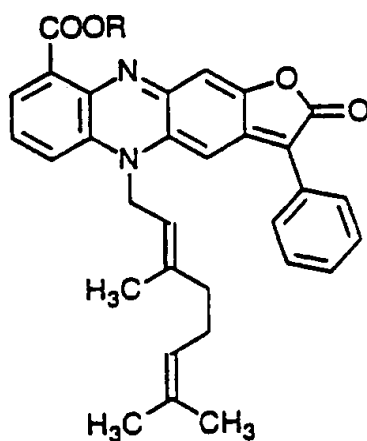
また、活性酸素が関与すると考えられる疾患には、炎症、リウマチ関節炎、自己免疫疾患、放射線による皮膚疾患、パーキンソン氏病、心臓や脳の虚血障害がある。活性酸素を適切に除去できる抗酸化剤が得られれば、その抗酸化剤は、これらの疾患の治療薬として利用できることが予想される。

ところで、微生物学において知られている多数の微生物の大部分が、土壤中に生存している。抗生物質のような有用な物質を生産する微生物、特に放線菌も、大部分が土壌由来である。土壌中から、新規で有用な物質を生産する微生物を見出す作業が、従来から続けられている。例えば、特開昭64-22861号公報には、ストレプトマイセス属に属する菌株から生産された下記の化合物が開示されている。



特開昭64-22861号公報の記載によると、上記化合物は、スーパーオキサイドを除去する作用を有する。

また、Tetrahedron Letters 32, No.7, 943-946(1991) には、ストレプトマイセス属に属する菌株から生産された下記の化合物が開示されている。



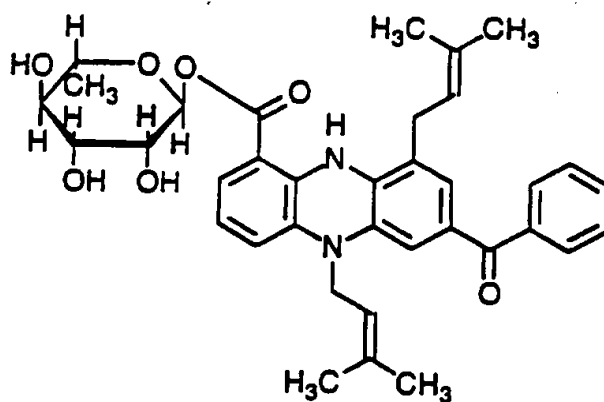
上記RはHまたはCH<sub>3</sub>である。

上記論文の記載によると、上記化合物は、ビタミンEのような、ラジカルのカベンジャーとしての機能を示す。

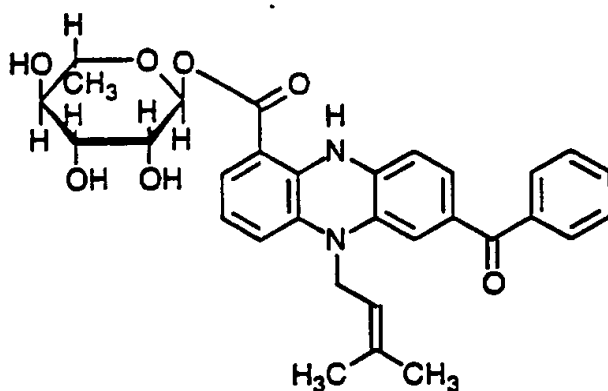
本発明者は、土壤中からストレプトマイセス属に属する新しい放線菌の菌株を発見した。この菌株は、1994年12月22日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託しており（受託番号：FERM P-14717）、そして特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づいて、1995年11月27日に工業技術院生命工学工業技術研究所へ国際寄託した。受託番号は、FERM BP-5303である。

#### [発明の開示]

本発明者が、この菌株について研究を進めたところ、この菌株は、下記式I又はIIで表わされる新規なジヒドロフェナジン誘導体を生産することが判明した。



I



II

本発明のジヒドロフェナジン誘導体 I 及び II について、さらに研究を進めたところ、この物質はいずれも、グルタミン酸毒性の抑制作用および抗酸化作用を有していることが判明した。

#### 〔図面の簡単な説明〕

第 1 図は、ジヒドロフェナジン誘導体 I の紫外-可視吸収スペクトルを示すグラフである。

第 2 図は、ジヒドロフェナジン誘導体 I の赤外吸収スペクトルを示すグラフである。

第 3 図は、ジヒドロフェナジン誘導体 I の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを示すグラフである。

第4図は、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示すグラフである。

第5図は、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅱの紫外-可視吸収スペクトルを示すグラフである。

第6図は、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅱの赤外吸収スペクトルを示すグラフである。

第7図は、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅱの $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示すグラフである。

第8図は、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅱの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示すグラフである。

第9図は、菌株の顕微鏡写真（100倍）である。

第10図は、菌株の顕微鏡写真（約12000倍）である。

第11図は、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰによるグルタミン酸毒性抑制作用の測定結果を示すグラフである。

第12図は、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅱによるグルタミン酸毒性抑制作用の測定結果を示すグラフである。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

まず、新規なジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ（即ち、式Ⅰで表わされる化合物）について説明する。

化学構造は、上記式Ⅰの通り、ピラノース構造を有する $\alpha$ -L-ラムノースの1位の水酸基と、カルボキシルジヒドロフェナジン誘導体のカルボキシル基とがエステル結合している。なお、このエステル結合は、加水分解および再結合が可能である。従って、この化合物を $\alpha$ -L-ラムノースとカルボキシルジヒドロフェナジン誘導体とに分解し、分解産物であるカルボキシルジヒドロフェナジン誘導体と他の糖とをエステル結合させて、他の種類のジヒドロフェナジン誘導体を合成することもできる。

ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰの物理化学的な性質は以下の通りである。

形状： オレンジ色粉末

融点: 63.0~64.0℃

比旋光度:  $[\alpha]_D^{20} = -139.8^\circ$  ( $C=0.006$ , メタノール)

分子式:  $C_{28}H_{40}N_2O_7$

分子量: 612.2841 (実測値, HRFAB-MS)

612.2835 (計算値)

溶解性: メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシド、及びアセトンに可溶、ヘキサンに不溶

上記分子式および分子量は、*m*-ニトロベンジルアルコールをマトリックスとして用いたFABマススペクトルによって決定した。この化合物は、FABマススペクトルにおいて、*m/z* 612の (*M*)<sup>+</sup>ピークを示した。

第1図に、ジヒドロフェナジン誘導体Iの紫外-可視吸収スペクトルを示す。測定はメタノール中で実施し、走査速度は120.0nm/分である。バンドパスは2.00nmである。第1図に示されているように、232nm (26900)、246nm (25800)、298nm (19000)、368nm (3300)、及び495nm (9700)に吸収ピークが存在する。酸およびアルカリによる吸収ピークの変化は見られなかった。

第2図に、ジヒドロフェナジン誘導体Iの赤外吸収スペクトルを示す。測定はKBr錠剤法により実施した。赤外吸収スペクトルにおいて、水酸基 (3450  $\text{cm}^{-1}$ )、第2級アミン (3330  $\text{cm}^{-1}$ )、ケトン (1680  $\text{cm}^{-1}$ ) およびエステル (1680  $\text{cm}^{-1}$ , 1260  $\text{cm}^{-1}$ ) に由来する吸収が観測された。

第3図に、ジヒドロフェナジン誘導体Iの  $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す。測定は、500MHzで、重アセトン中で実施した。

第4図に、ジヒドロフェナジン誘導体Iの  $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す。測定は、500MHzで、重アセトン中で実施した。

なお、ジヒドロフェナジン誘導体Iの薄層クロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール=10/1) のR<sub>f</sub>値は、0.42であった。

次に、新規なジヒドロフェナジン誘導体II (即ち、式IIで表わされる化合物) について説明する。

化学構造は、上記式IIの通り、ピラノース構造を有する $\alpha$ -L-ラムノースの

1位の水酸基と、カルボキシルジヒドロフェナジン化合物のカルボキシル基とがエステル結合している。なお、このエステル結合は、加水分解および再結合が可能である。従って、この化合物を $\alpha$ -L-ラムノースとカルボキシルジヒドロフェナジン化合物とに分解し、分解産物であるカルボキシルジヒドロフェナジン化合物と他の糖とをエステル結合させて、他の種類のジヒドロフェナジン化合物を合成することもできる。

ジヒドロフェナジン化合物IIの物理化学的な性質は以下の通りである。

形状： オレンジ色粉末

融点： 59.0～61.0℃

比旋光度：  $[\alpha]_D^{20} = -106.3^\circ$  (C=0.005, メタノール)

分子式：  $C_{31}H_{32}N_2O_7$

分子量： 544.2211 (実測値, HRFAB-MS)

544.2209 (計算値)

溶解性： メタノール、クロロホルム、ジメチルスルホキシド、及びアセトンに可溶、ヘキサンに不溶

上記分子式および分子量は、m-ニトロベンジルアルコールをマトリックスとして用いたFABマススペクトルによって決定した。この化合物は、FABマススペクトルにおいて、 $m/z$  544の(M)<sup>+</sup>ピークを示した。

第5図に、ジヒドロフェナジン化合物IIの紫外-可視吸収スペクトルを示す。測定は、メタノール中で実施し、走査速度は120.0nm/分である。バンドパスは、2.00nmである。第5図に示されているように、229nm (28900)、245nm (27400)、296nm (26000)、367nm (4000) および490nm (11700) に吸収ピークが存在する。酸およびアルカリによる吸収ピークの変化は見られなかった。

第6図にジヒドロフェナジン化合物IIの赤外吸収スペクトルを示す。測定は、KBr錠剤法により実施した。赤外吸収スペクトルにおいて、水酸基 ( $3450\text{ cm}^{-1}$ )、第2級アミン ( $3330\text{ cm}^{-1}$ )、ケトン ( $1680\text{ cm}^{-1}$ ) およびエステル ( $1680\text{ cm}^{-1}$ ,  $1260\text{ cm}^{-1}$ ) に由来する吸収が観測された。

第7図にジヒドロフェナジン化合物IIの<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。測定



は、500MHzで、重アセトン中で実施した。

第8図にジヒドロフェナジン化合物Ⅱの<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す。測定は、500MHzで、重アセトン中で実施した。

なお、ジヒドロフェナジン化合物Ⅱの薄層クロマトグラフィー（クロロホルム／メタノール＝10／1）のR<sub>f</sub>値は、0.42であった。

上記ジヒドロフェナジン誘導体ⅠおよびⅡは、いずれも現時点では、本発明者が発見した菌株の培養によってのみしか得られていない。

次に、この菌株について説明する。

1995年11月27日に工業技術院生命工学工業技術研究所へ寄託した、受託番号FERM BP-5303の菌株は、東京都文京区で採取された土壌見本から単離されたものである。この菌株は、ストレプトマイセス属に属する放線菌である。

形態としてはまず、基生菌糸が分断しない。気菌糸は短い主軸を形成し、それより不規則に直状または曲状に長く分岐し、10～50個またはそれ以上の胞子鎖を形成する。胞子は非運動性で、円筒形あるいは長楕円形を呈し、幅0.5乃至0.8μmである。また、胞子表面は平滑である。菌核、胞子嚢、その他の特殊形態は観察されない。細胞壁化学型は、I型である。

この菌株の顕微鏡写真を第9図（100倍）及び第10図（約12000倍）に示す。なお、第10図に見える白いバーの長さは、500nmである。

次に、菌株を（1）シュクロース・硝酸塩寒天培地、（2）グルコース・アスパラギン寒天培地、（3）グリセリン・アスパラギン寒天培地、（4）無機塩・スターチ寒天培地、（5）チロシン寒天培地、（6）栄養寒天培地、（7）イースト・麦芽寒天培地及び（8）オートミール寒天培地で培養した結果を示す。

上記各種培地上での培養性状を第1表に示す。

第1表

培地	集落表面の菌叢色	集落の裏面色	拡散性色素
(1) 灰色系列	(d)	明茶味灰色	(5cb) なし
(2) 灰色系列	(3fe)	暗茶色	(6pl~6pn) 淡橙色 (5ca)
(3) 灰色系列	(d)	暗赤味茶色から暗茶色	(6pl~6pn) 淡橙色 (4ea)
(4) 灰色系列	(3fe~5fe)	暗茶色	(6nl) 淡赤色 (6l/2gc)
(5) 灰色系列	(5fe)	暗赤味橙色	(6le) 桃味白色 (5cb)
(6) 気菌系なし		明茶味灰色	(3ec~3dc) なし
(7) 灰色系列	(5fe)	茶色から暗茶色	(5ni~5pn) 暗橙色 (5ic)
(8) 灰色系列	(3fe~5fe)	灰味赤茶色	(6l/2ni) 淡赤色 (7gc)

註：カッコ内は、カラー・ハーモニー・マニュアル（コンテナー・コーポレーション・オブ・アメリカ、1950）の色標コードを示す。

第1表に示されているように、集落表面の菌叢色は灰色系列である。また、裏面色は暗赤味茶色および暗茶色を呈する。拡散性色素は、淡橙色から淡赤色や暗橙色が認められる。これらの色素の色相は、pHの変動では変化しなかった。

さらに、生理的性状および炭素源の同化性を下記第2表に示す。

第2表

### 生理的性状および炭素源の同化性

生育温度範囲	20~37℃
最適温度	30~37℃
メラニン様色素の生産：チロシン寒天培地	+
ペプトン・イースト鉄寒天培地	+
トリプトン・イースト・ブロス培地	+
スターチの加水分解	+
ゼラチンの液化	+
脱脂牛乳のペプトン化	+
脱脂牛乳の凝固	-
硝酸塩の還元	+
炭素源の同化：D-グルコース	+
L-アラビノース	+
D-キシロース	+
D-フラクトース	-
シュクロース	-
L-ラムノース	-
ラフィノース	-
i-イノシトール	-
D-マンニット	+

以上のように、本菌株は中温性であり、炭素源の同化能としては、グルコース、アラビノース、キシロース、マンニットを利用する。本菌株の形態的性状と細胞壁化学型から、本菌株はストレプトマイセス属に位置する。

上述の諸性状（孢子鎖形態、孢子表面、菌叢色、裏面色、拡散性色素、炭素源の同化能等）をもとに、「細菌名承認リスト、1980」およびそれ以降の有効

名リストに記載されたストレプトマイセス属の種について検索し、近縁種を選出した。

ストレプトマイセス・パーベオフスカス (*Streptomyces purpeofuscus*) の診断性状を選択すると、下記第3表に示すように、本菌株とストレプトマイセス・パーベオフスカスの性状は、炭素源の同化能（マンニットのみ異なる）以外は、よく一致している。

第3表

比較項目	本菌株	ストレプトマイセス・ パーベオフスカス
孢子鎖形態：直状または曲状	+	+
孢子表面：平滑	+	+
菌叢色：灰色	+	+
裏面色：赤／橙色	+	+
pH感受性	—	—
拡散性色素：産生	+	+
pH感受性	—	—
メラニン色素産生	+	+
スターチの加水分解	+	+
硝酸塩の還元	+	+
生育温度：10℃	—	—
37℃	+	+
45℃	+	+
炭素源の同化能：アラビノース	+	+
キシロース	+	+
イノシトール	—	—
マンニット	+	—
ラムノース	—	—

ラフィノース	—	—
シュクロース	—	—
フラクトース	—	—
ガラクトース	+	+

以上のように、本菌株は、ストレプトマイセス・パーベオフスカスが最も近似であるので、その種名で寄託した。寄託した菌株の表示（寄託者が付した識別のための表示）は、2887-SVS2である。

本発明のジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡは、本菌株のような生産菌を適当な培地で好氣的に培養し、培養物から目的物を採取することにより製造できる。

培地は、ジヒドロフェナジン誘導体生産菌が利用できる栄養源から構成する。炭素源としては、グリセロールが好ましい。窒素源としては、モラセス、カゼインおよびポリペプトンが好ましく利用できる。また、必要に応じて無機塩類を添加することができる。醗酵中の発泡を抑制するために、適当な消泡剤（例、シリコーン）を添加してもよい。

ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡの大量生産には、好氣的深部培養条件を採用することが好ましい。この条件は、他の一般的な生物活性物質の大量生産のための培養条件と同様である。少量生産の場合は、フラスコ内での振盪培養を採用することができる。

また、ジャー・ファーメンターを用いて培養してもよい。その場合、生産過程における生育遅延を避けるために、醗酵槽への接種には微生物の栄養細胞を用いることが好ましい。このためには、比較的少量の培地に微生物の細胞を接種し、該接種培地を培養して微生物の栄養細胞を生産し、次に培養した栄養細胞を醗酵槽に移すことが好ましい。栄養細胞を生産するための培地は、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡを生産するための培地と異なるものであってもよい。

培養混合物の攪拌および通気は、通常の方法で実施できる。攪拌には、プロペラまたは類似の機械的攪拌装置を用いることができる。醗酵槽の回転または振盪により攪拌してもよい。通気には、種々のポンプ装置を用いることができる。また、培地に滅菌空気を通すことにより通気してもよい。

醗酵温度は、一般に10乃至40℃、好ましくは20乃至30℃である。醗酵時間は、一般に50乃至200時間である。醗酵時間は、醗酵条件および規模に応じて変化する。

醗酵が完了後、種々の慣用的な回収および精製方法により、培養液からジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡを回収できる。回収方法としては、溶媒抽出、クロマトグラフィーあるいは再結晶化が採用できる。溶媒抽出および再結晶化では、ジヒドロフェナジン誘導体ⅠそしてⅡのそれぞれに適当な溶媒を用いる。二種類以上の溶媒を併用してもよい。

ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡは、一般に培養菌体成分中に見出される。従って、培養液を遠心あるいは濾過して得られた菌体を適当な溶媒で抽出してから、ジヒドロフェナジン誘導体の精製処理を実施することが好ましい。溶媒としては、アセトンやメタノールを用いることができる。

ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡの精製は、抽出液を慣用的な方法に従って処理することにより実施できる。例えば、抽出液から蒸発あるいは蒸留によって溶媒を除去した後、適当な溶媒（例、酢酸エチル）で再抽出、乾固を繰り返し、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡを含有する残留物を得ることができる。これを粗標品として、慣用的な精製方法、例えば、シリカゲルクロマトグラフィーやHPLC分取を行ない、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡをそれぞれ精製することができる。

本菌株以外の微生物についても、通常の方法によって、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡの生産株を、自然界から分離することが可能である。具体的には、抗生物質生産菌の単離方法と同様に実施できる。また、本菌株に、放射線照射や他の突然変異を誘発する処理を実施して、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡの生産性を向上させてもよい。

ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡの生合成は、放線菌が生産する抗生物質と同様に多くの遺伝子が関与すると推定される。遺伝子組替え技術の発達に伴い、このような物質の生合成についても、遺伝子操作が可能になっている。従って、この菌株のジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡの生合成に関与する遺伝子を、他の菌株に導入して、得られた形質転換株にジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡを

生産させることもできる。

以上のように得られたジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡは、グルタミン酸毒性の抑制作用を示す。また、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡは、抗酸化作用も有する。従って、本発明のジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡは、グルタミン酸毒性の抑制剤または抗酸化剤として有用である。

本発明のジヒドロフェナジン誘導体のグルタミン酸毒性の抑制作用は、いずれも従来知られている化合物よりも強く、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅰについては数nMでグルタミン酸毒性を50%程度抑制することができ、ジヒドロフェナジン誘導体Ⅱについては十数nMでグルタミン酸毒性を50%程度抑制することができる。公知のグルタミン酸毒性の抑制作用を示す化合物は、軽度の脳虚血による神経細胞死を抑制し、脳代謝を賦活する。従って、本発明のジヒドロフェナジン誘導体Ⅰ及びⅡも、脳梗塞や脳血管性痴呆症のような脳虚血障害に対する治療薬として有効である。

グルタミン酸は、様々な機構により毒性を発現することが示唆されているが、いずれの系においても活性酸素のようなフリーラジカルが発現に関与するとされている。このため、ビタミンEのような抗酸化剤がグルタミン酸毒性を抑制することが知られている。本発明のジヒドロフェナジン誘導体も、同様な抗酸化作用を示す。従って、本発明のジヒドロフェナジン誘導体は、活性酸素が関与する疾患、例えば炎症、関節リウマチ、自己免疫疾患の治療薬としても有効である。

#### [実施例1]

##### (1) 醗酵

スターチ(1%)、ポリペプトン(1%)及び肉エキス(1%)を含有するP C I培地(滅菌前pH7.0)15mLを分注した試験管に、ストレプトマイセス・パーベオフスカス2887-SVS2株の斜面培養1白金耳を接種し、27℃で3日間振盪培養を行なった。次に、この前培養物2mLを、グリセリン(2%)、モラセス(1%)、カゼイン(0.5%)、ポリペプトン(0.1%)及び炭酸カルシウム(0.4%)を含有する培地100mLを分注した、こぶ付き500mL三角フラスコ6本に接種し、27℃で2日間振盪培養を行なった。

以上の様に調製した種600mLをグリセリン(2%)、モラセス(1%)、

カゼイン（0.5%）、ポリペプトン（0.1%）および炭酸カルシウム（0.4%）を含有する生産培地60リットルに接種した。培養は、ジャー・ファーマンターにて毎分30リットルの通気と400rpmの攪拌を行ないながら、27℃で3日間醗酵を行なった。

## （2）単離と精製

培養液60リットルを遠心分離し、得られた菌体を等量のアセトンにて抽出した。アセトンを濃縮除去後、pH3.0の条件で酢酸エチルにて抽出した。有機相を減圧濃縮したのち、ヘキサンで洗浄後、不溶性画分をシリカゲルクロマトグラフィー（WAKOGEL C-100、500mL）に付した。カラムをヘキサン／酢酸エチル＝2／1（1.5リットル）で洗い、クロロホルム／メタノール＝20／1（1.5リットル）にて溶出した。活性画分を集め、減圧濃縮したのち、逆相シリカゲルカラム（Senshu ODS-SS-1020-T、500mL）に付し、90%メタノールにて溶出した。得られた活性画分を減圧濃縮したのち、逆相シリカゲルカラム（Senshu Pak. PEGASIL ODS、直径20mm×250mm）を用いて、90%メタノールの溶媒系にてHPLC分取を行なった。活性ピークを減圧濃縮して、本発明のジヒドロフェナジン誘導体Iを、赤色粉末として300mgを得た。

## 〔実施例2〕

実施例1記載の方法と同じ方法で調製した培養液30Lを遠心分離し、得られた菌体を等量のアセトンにて抽出した。アセトンを濃縮除去した後、pH3.0にて酢酸エチルで抽出した。有機相を減圧濃縮した後、ヘキサンで洗浄後、不溶性画分をシリカゲルクロマトグラフィー（WAKOGEL C-100、500mL）に付した。カラムをヘキサン／酢酸エチル＝2／1（1.5リットル）で洗い、クロロホルム／メタノール＝20／1（1.5リットル）で溶出した。活性画分を集め減圧濃縮した後、逆相シリカゲルカラム（Senshu ODS-SS-1020-T、500mL）に付し90%メタノールにて溶出した。得られた活性画分を減圧濃縮した後、逆相シリカゲルカラム（Senshu Pak. PEGASIL ODS、直径20mm×250mm）を用いて、85%メタノールの溶媒系にてHPLC分取を行なった。活性ピークを減圧濃縮して、本発明のジヒドロフェナジン誘導体IIを赤色粉末として30mgを得た。



## [実施例3]

## 「神経細胞に対するグルタミン酸毒性抑制効果」

グルタミン酸毒性抑制試験では、マウス神経芽細胞腫とラット網膜神経細胞とのハイブリドーマ (N18-RE-105細胞) を用いた。

このハイブリドーマに、高濃度のグルタミン酸 (1~10 mM) を添加するとシスチンの細胞内取り込み阻害による酸化ストレスによる細胞死が認められる (Neuron 2, 1547 (1989)、および J. Pharmacol. Exp. Ther, 250, 1132 (1989) 参照)。このグルタミン酸誘発細胞死に対する本発明のジヒドロフェナジン誘導体 I 及び II の作用を調べた。

10% FCS および HAT (hypoxanthine 0.1 mM, aminopterin 40 nM, thymidine 0.14 mM、シグマ社製) を含むダルベッコ変法 MEM 培地を入れた 96 穴マイクロプレートに  $6.25 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> となるようにハイブリドーマ細胞を接種した。24 時間後、10 mM グルタミン酸と本発明のジヒドロフェナジン誘導体を添加した。グルタミン酸添加後、さらに 24 時間培養したのち、細胞および培地中に含まれている乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定した。下記式のように LDH 放出率を計算して、グルタミン酸毒性を評価した。

LDH 放出率 =

$$\{ \text{培地内 LDH 活性} / (\text{細胞内} + \text{培地内 LDH 活性}) \} \times 100$$

ジヒドロフェナジン誘導体 I 及び II のそれぞれの測定結果を第 11 図と第 12 図とに示す。これらの図は、横軸を本発明のジヒドロフェナジン化合物の濃度、縦軸を LDH 放出率として、測定結果をプロットしたグラフである。

## [実施例4]

## 「脂質過酸化抑制作用」

ウイスター系の雄性ラットの肝臓から Ernster, L. 等の方法 (J. Cell Biol. 15, 541 (1962)) に従い、ミクロソームを調製した。

肝ミクロソーム (タンパク量 0.5 mg)、0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4)、2 mg/mL ADP、被検物質 (本発明のジヒドロフェナジン誘導体 I) の DMSO (ジメチルスルホキシド) 溶液、そして 0.5 mg/mL で NADPH を含む反応溶液 0.5 mL を 37℃ で 1 時間インキュベートした。反応

容器を氷水中に移し、直ちに0.5%ブチルヒドロキシトルエノール溶液0.05mLを加えて反応を停止させ、更に8.1%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム塩）0.25mL、20%酢酸1.75mLそして0.8%チオバルビツール酸溶液（pH3.5）1.5mLを加えた。反応容器を沸騰水中に移し、1時間加熱して発色させた。冷却後、n-ブタノール4mLを加えて振盪したのち、遠心分離（3000rpm、10分間）し、上清の530nmにおける吸光度を測定して、被検物質の脂質過酸化反応に対する抑制率を求めた。

結果を第4表に示す。

第4表

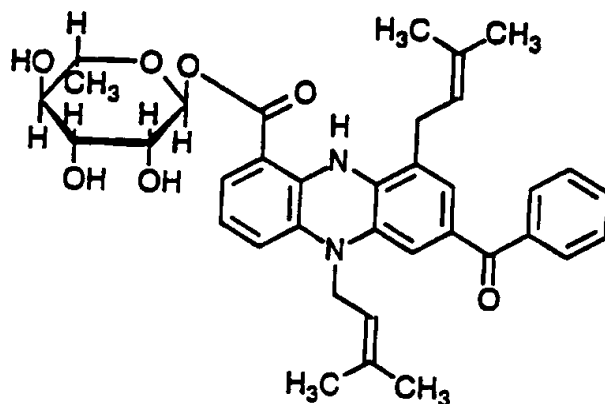
濃度	抑制率	IC <sub>50</sub> (M)
10 <sup>-7</sup> M	-0.5%	
10 <sup>-6</sup> M	31.5%	1.5×10 <sup>-6</sup>
10 <sup>-5</sup> M	95.0%	
10 <sup>-4</sup> M	99.1%	

〔産業上の利用可能性〕

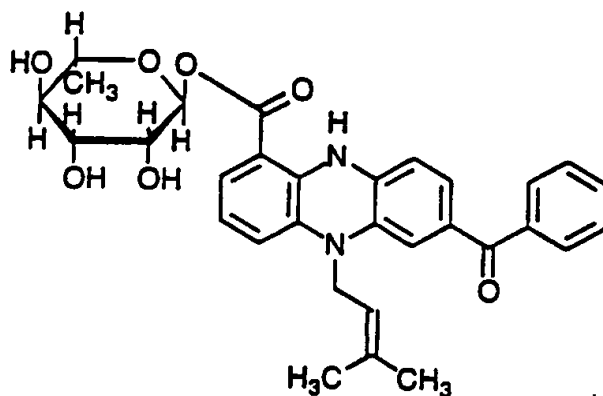
本発明のジヒドロフェナジン誘導体は、グルタミン酸毒性の抑制作用及び抗酸化作用を示す。従って、本発明のジヒドロフェナジン誘導体は、グルタミン酸毒性の抑制剤または抗酸化剤としての効果を有する。

請 求 の 範 囲

1. 下記式で表わされるジヒドロフェナジン誘導体。



2. 下記式で表わされるジヒドロフェナジン誘導体からなるグルタミン酸毒性の抑制剤。



3. 請求の範囲1及び2に記載されたいずれかのジヒドロフェナジン誘導体からなる抗酸化剤。

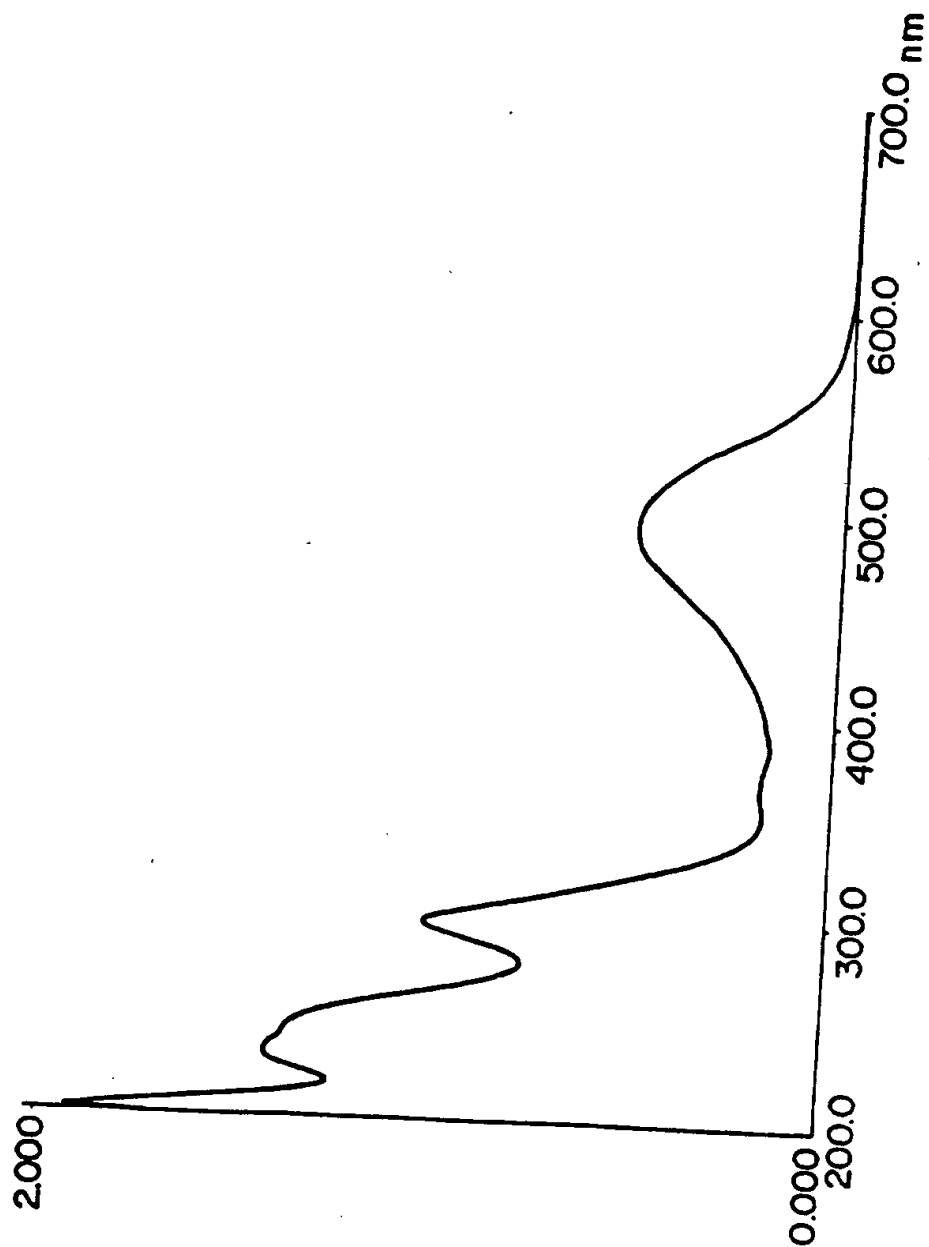
4. 請求の範囲1及び2に記載されたいずれかのジヒドロフェナジン誘導体からなるグルタミン酸毒性の抑制剤。

5. ストレプトマイセス属に属し、請求の範囲1及び/又は2に記載されたジヒドロフェナジン誘導体を生産する能力を有する放線菌の菌株。

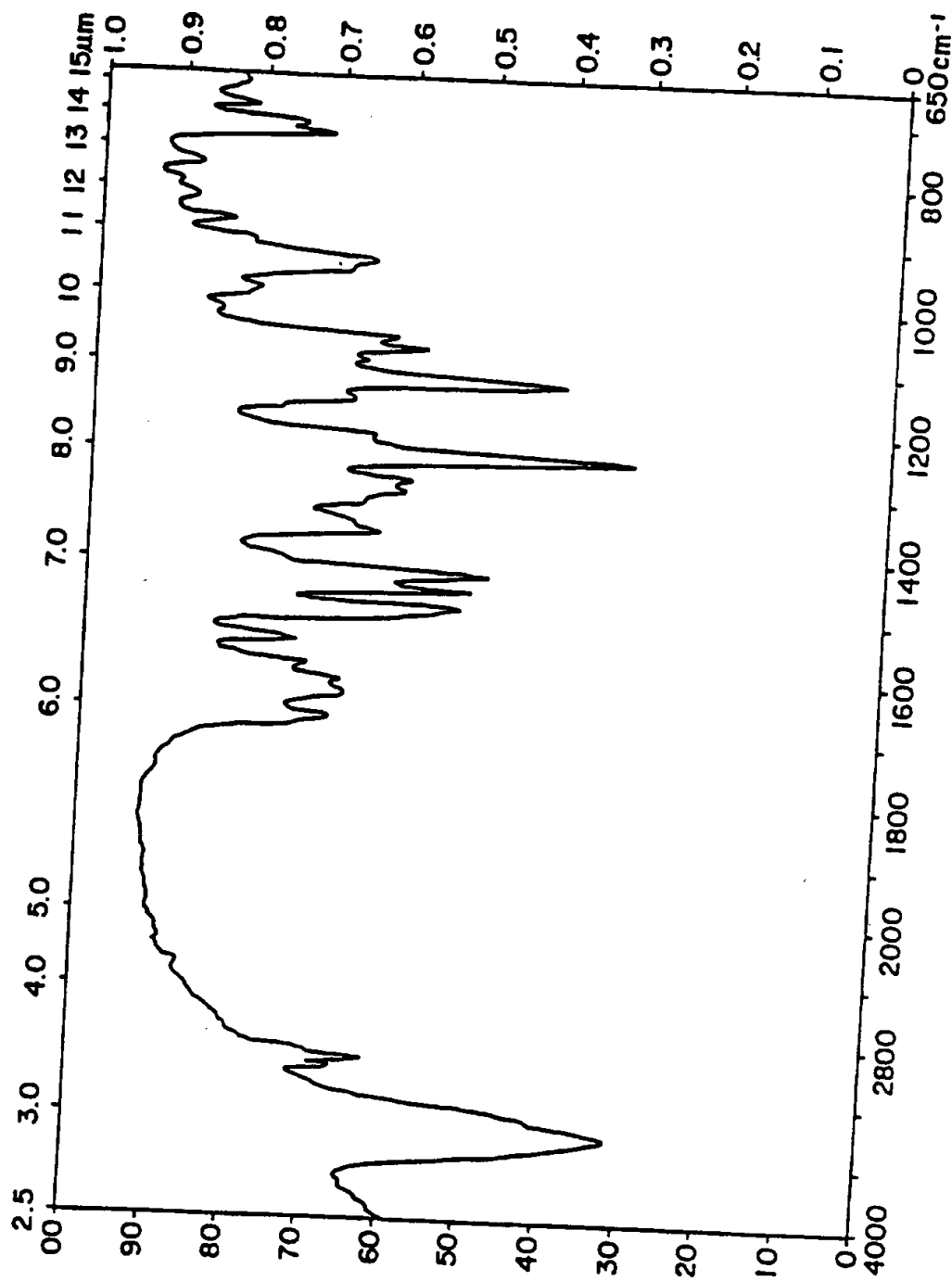
6. ストレプトマイセス属に属し、受託番号FERM BP-5303にて工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託された放線菌の菌株。

7. ストレプトマイセス属に属し、受託番号FERM BP-5303にて工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託された放線菌の菌株から生産され、哺乳類の神経細胞に対するL-グルタミン酸の毒性を抑制する作用を有する物質。

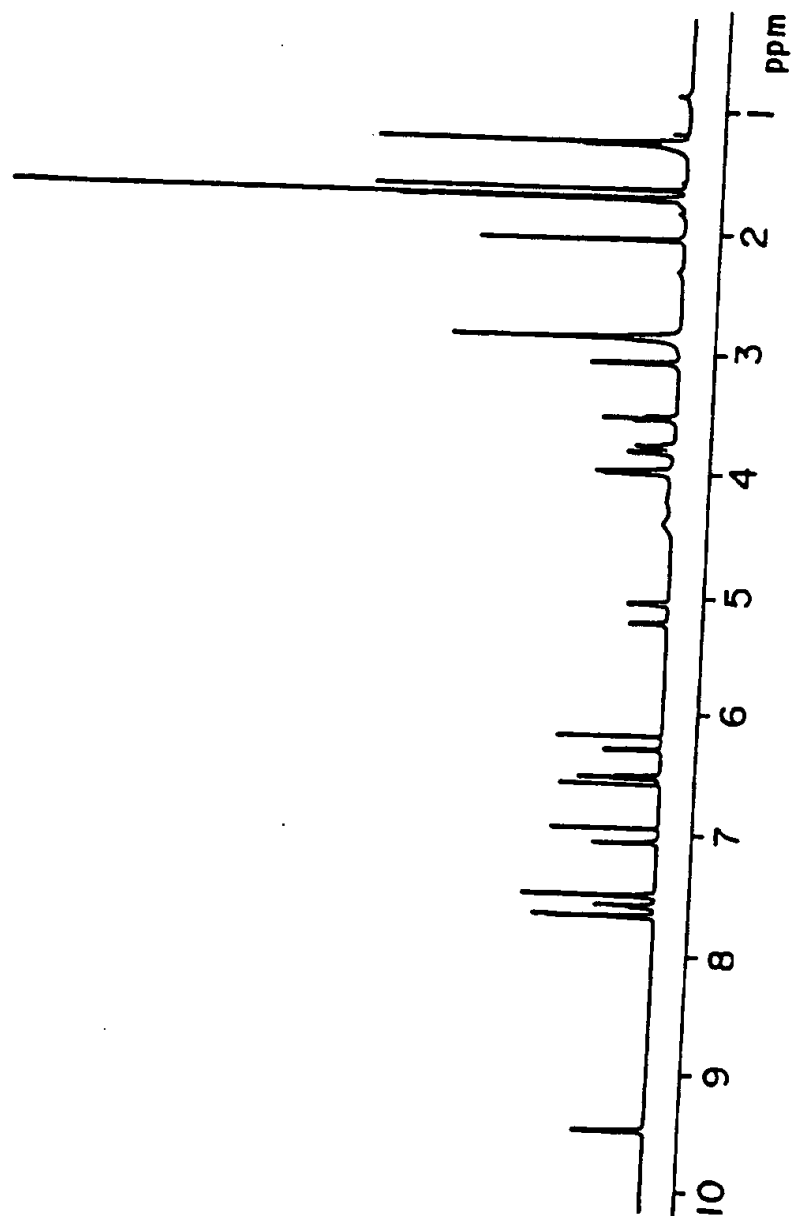
第1図



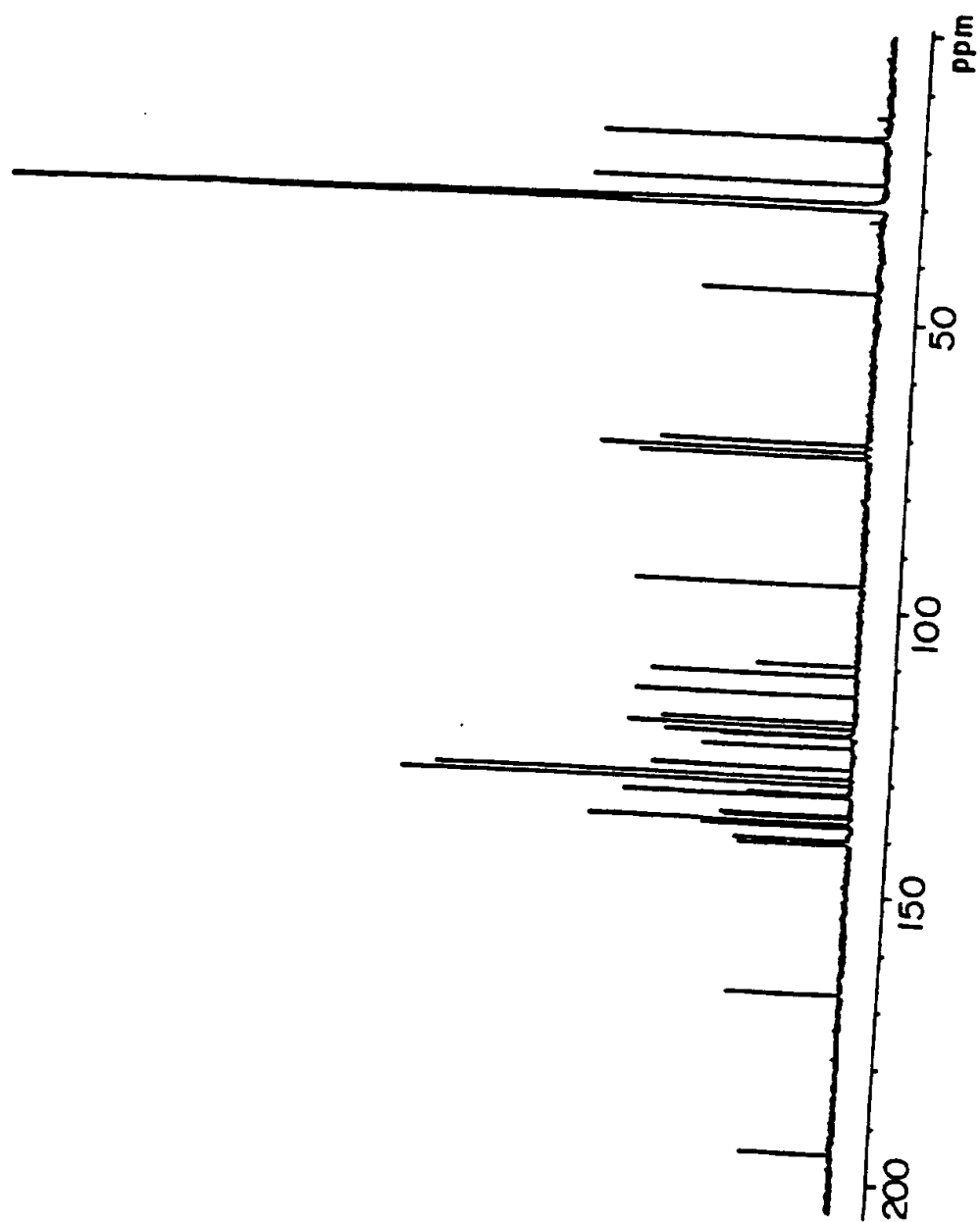
第2図



第3図

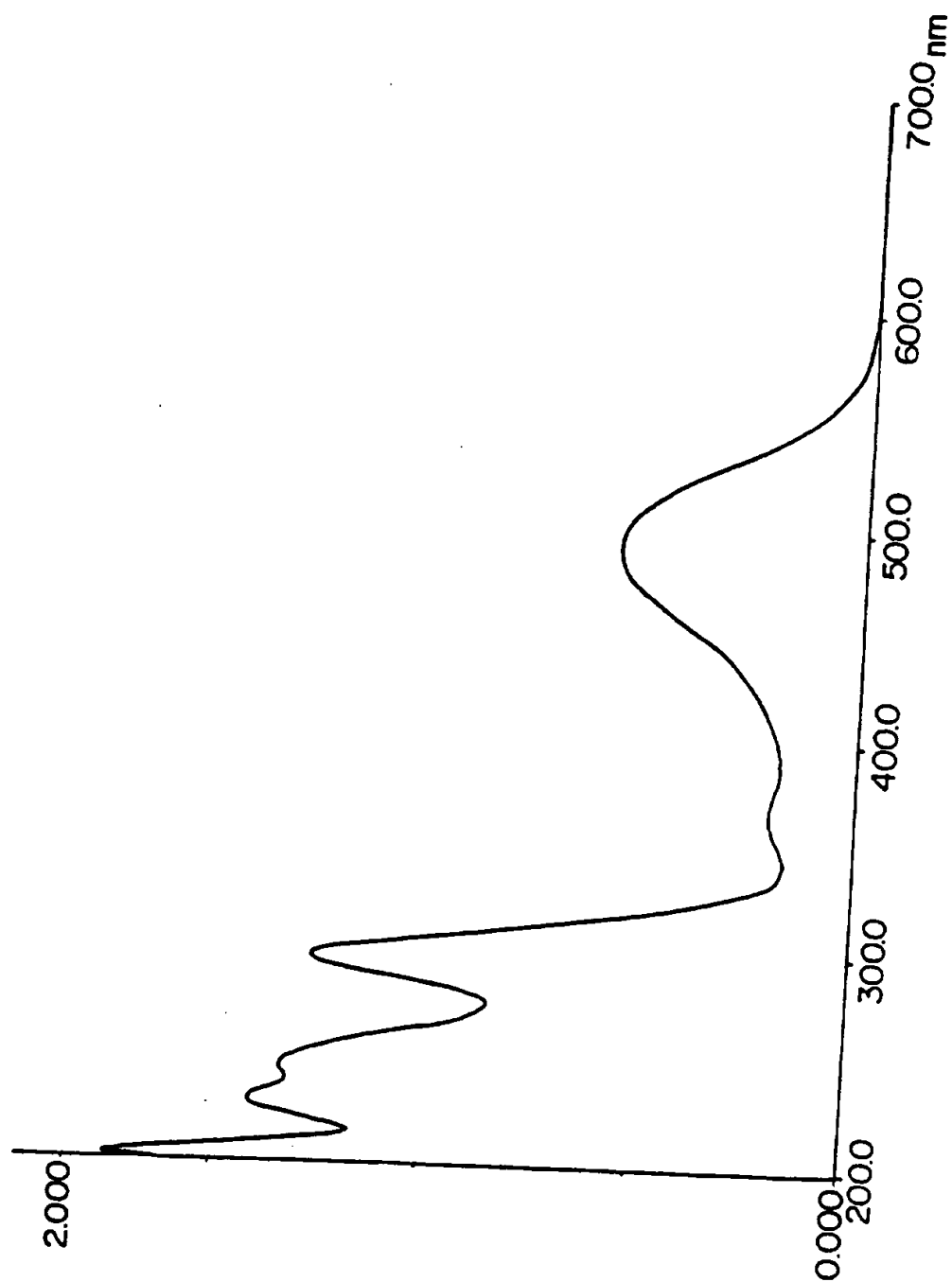


第4図

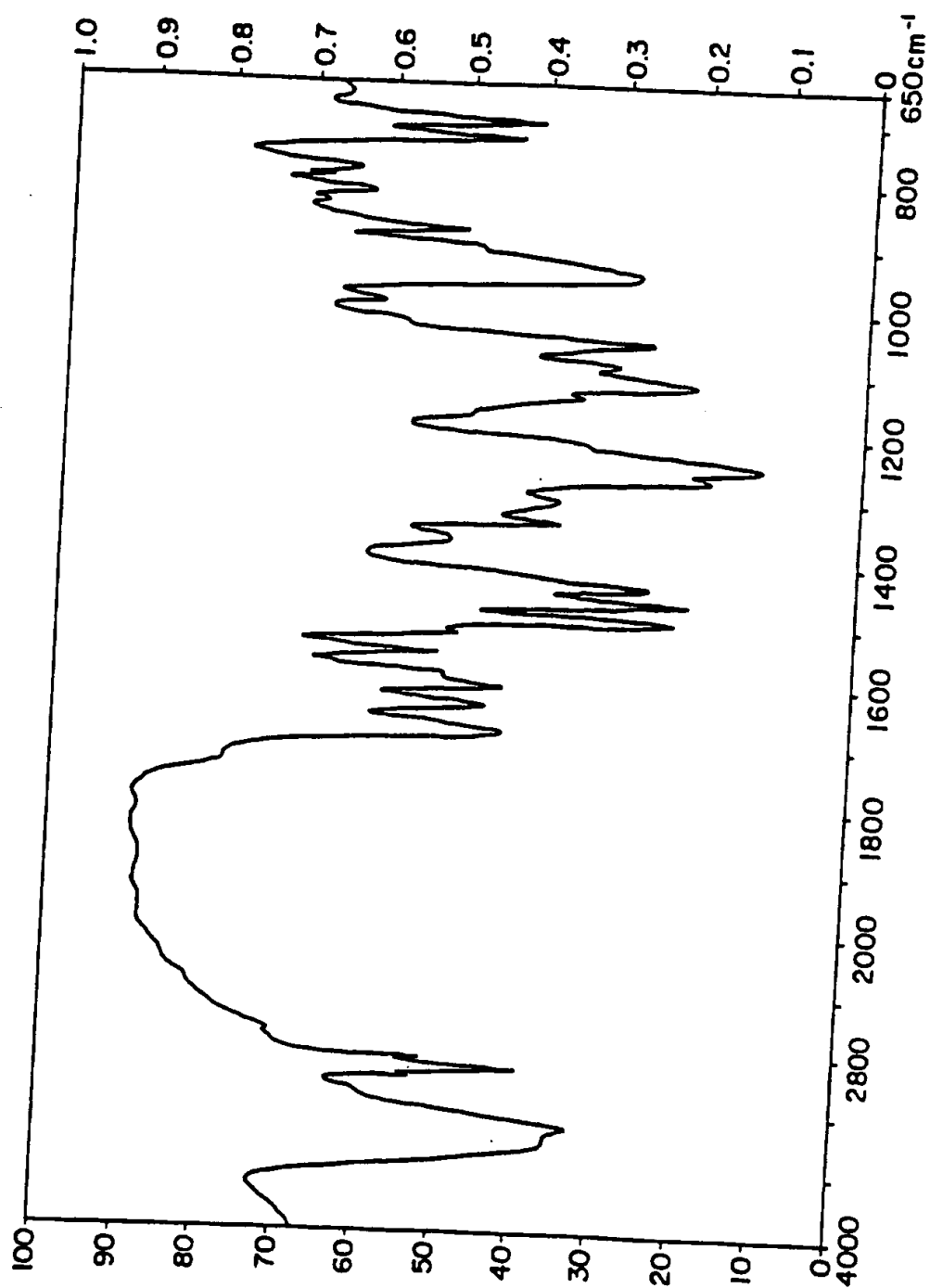




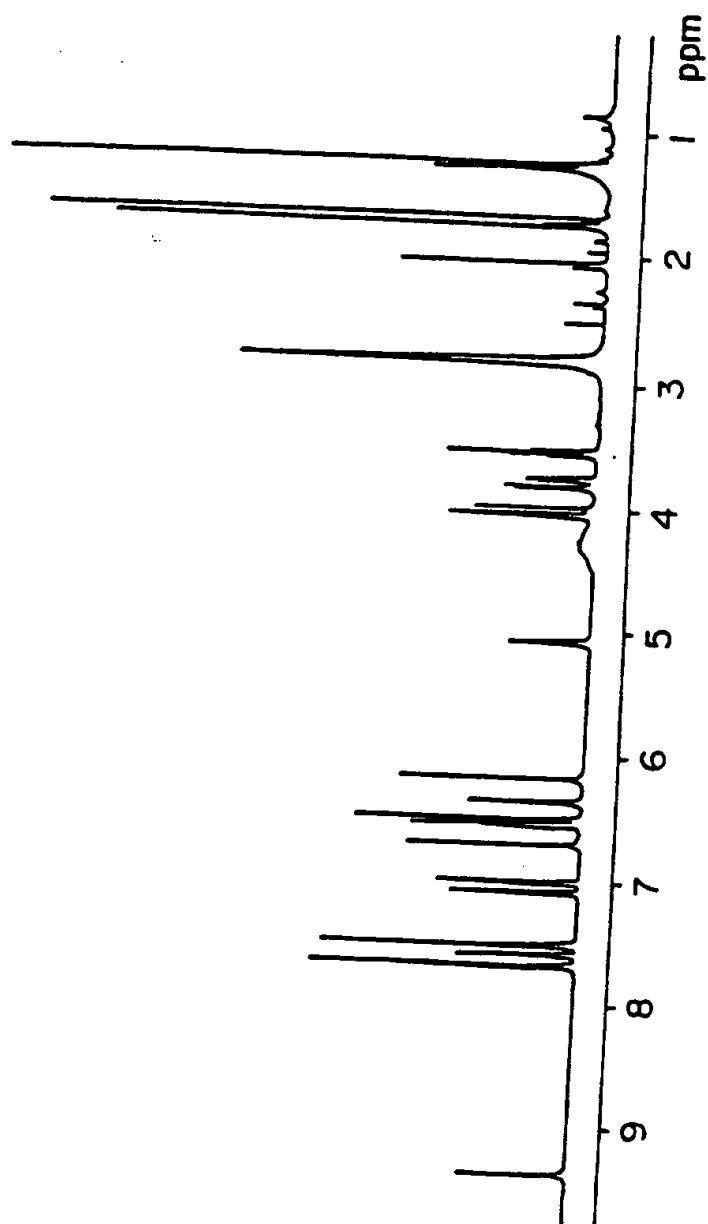
第5図



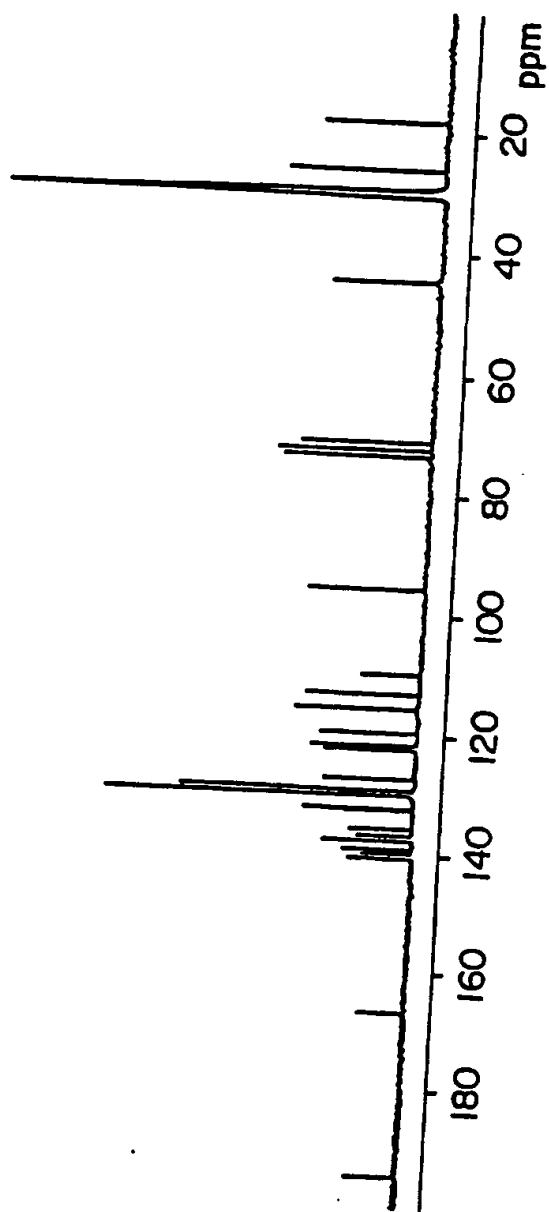
第6図



第7図



第8図



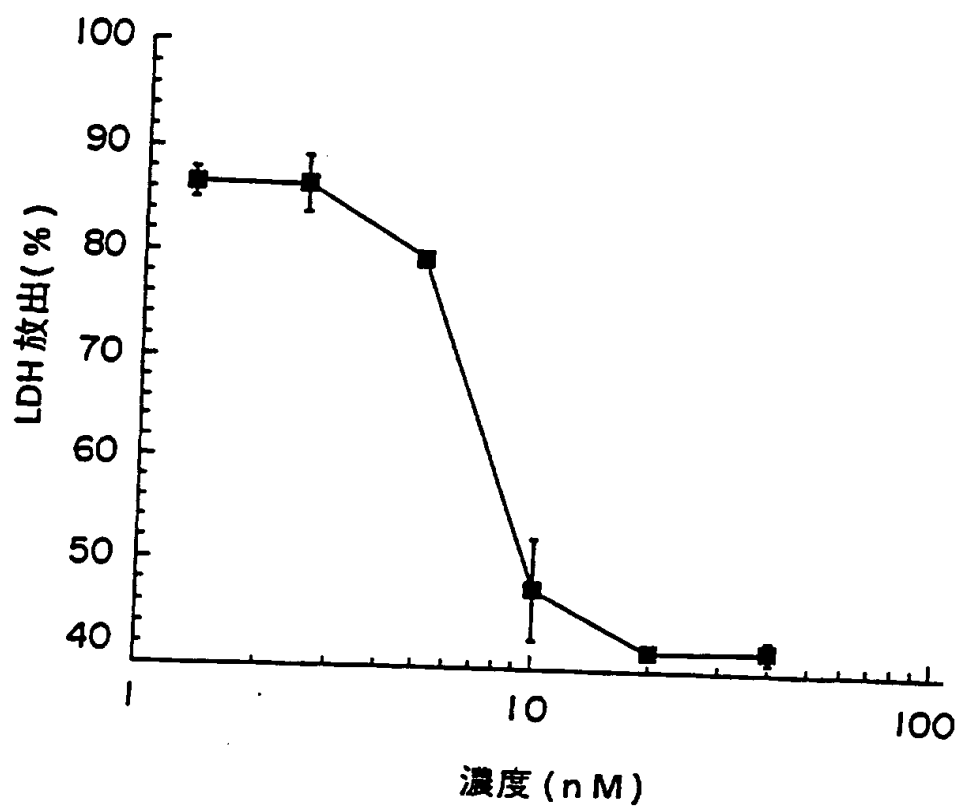
第9図



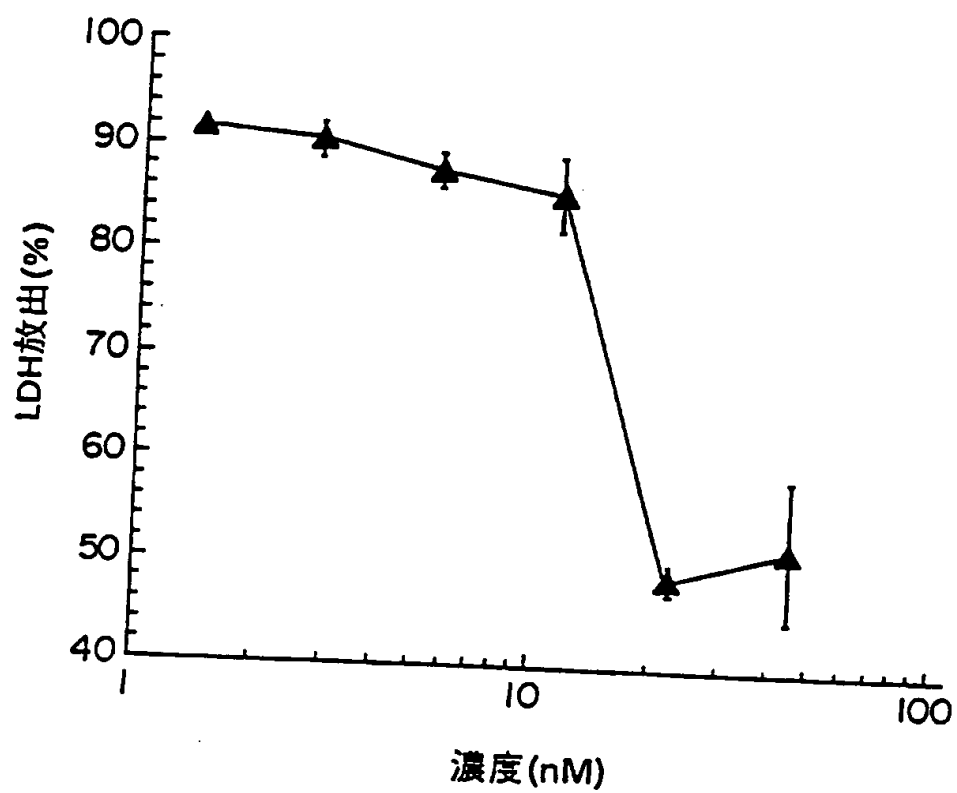
第10図



第 11 図



## 第12図



(11/11)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00128

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C07H17/02, C12P19/58, A61K31/71, C09K15/30, C12N1/20//  
(C12P19/58, C12R1:465) (C12N1/20, C12R1/465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C07H17/02, C12P19/58, A61K31/71, C09K15/30, C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI/L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 6-135982 (Kirin Brewery Co., Ltd.), May 17, 1994 (17. 05. 94) (Family: none)	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

April 16, 1996 (16. 04. 96)

Date of mailing of the international search report

May 14, 1996 (14. 05. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C07H17/02, C12P19/58, A61K31/71, C09K15/30, C12N1/20// (C12P19/58, C12R1:465) (C12N1/20, C12R1/465)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C07H17/02, C12P19/58, A61K31/71, C09K15/30, C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, WPI/L

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 6-135982 (麒麟麦酒株式会社) 17. 5月. 1994 (17. 05. 94) (ファミリーなし)	

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 04. 96

国際調査報告の発送日

14.05.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁 査官 (権限のある職員)

谷 口 博

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448